

DERWENT-ACC-NO: 1985-238361

DERWENT-WEEK: 198539

COPYRIGHT 2005 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: New cinnamic acid derivs. - useful for inhibiting lignin
bio:synthesis in plants

INVENTOR: **BOUDET**, A; CAZAUX, L ; GORRICHON, L ; GRAND, C

PATENT-ASSIGNEE: CNRS CENT NAT RECH SCI[CNRS]

PRIORITY-DATA: 1984FR-0002681 (February 22, 1984)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
EP 155871 A	September 25, 1985	F	035	N/A
FR 2559763 A	August 23, 1985	N/A	000	N/A
JP 61017527 A	January 25, 1986	N/A	000	N/A

DESIGNATED-STATES: AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

CITED-DOCUMENTS: 1.Jnl.Ref; EP 57881 ; FR 4305

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
EP 155871A	N/A	1985EP-0400322	February 21, 1985
FR 2559763A	N/A	1984FR-0002681	February 22, 1984
JP 61017527A	N/A	1985JP-0034251	February 22, 1985

INT-CL (IPC): **A01G007/06**, A01N031/00 , A01N037/10 , A01N043/00 ,
C07C039/18 , C07C067/00 , C07C069/73 , C07D213/42 , C07D277/04 ,
C07D521/00

ABSTRACTED-PUB-NO: EP 155871A

BASIC-ABSTRACT:

Cinnamic acid cpds. of formula Ar-CR1 = CR2-7 (I) with inhibitory properties w.r.t. lignin biosynthesis in plants are new: Ar = aryl or heteroaryl, both opt. substd. R1 and R2 = H, halogen, alkyl or alkoxy; Y = a functional gp., e.g. COOR, COR, COSR, CONR'R, CH2OR, CH(R')OR or CH=NR; R and R' = H, alkyl, aminoalkyl, aryl or heterocycl. Pref. Ar = phenyl, pyridyl or pyrimidinyl, opt. substd. by OH, 1-4C alkoxy, NH2, mono- or di(1-4C alkyl)amino and/or arylamino; R1 = H or halogen; R2 = H.

USE/ADVANTAGE - (I) are useful for reducing the lignin content of crop plants, esp. fodder crops such as maize, grass and lucerne. They act by inhibiting cinnamyl alcohol dehydrogenase and/or cinnamoyl CoA reductase and are capable of reducing lignin contents by at least 40%. /0

TITLE-TERMS: NEW CINNAMIC ACID DERIVATIVE USEFUL INHIBIT LIGNIN BIO SYNTHESIS
PLANT

DERWENT-CLASS: C02 C03 D13 P13

CPI-CODES: C07-H; C10-A20; C10-A23; C10-B01A; C10-B01B; C10-B02A; C10-B02B; C10-B03A; C10-B03B; C10-B04A; C10-B04B; C10-C01; C10-C03; C10-C04C; C10-D01; C10-D03; C10-E02; C10-E04C; C10-F02; C10-G01; C10-G02; C10-H01; C12-G01; D03-G;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M2 *01*

Fragmentation Code

F010 F012 F013 F019 F020 F021 F029 F431 F432 F433
F499 F541 F542 F543 F599 F710 F799 G001 G010 G013
G015 G019 G040 G100 G111 G112 G113 H100 H101 H102
H103 H121 H122 H123 H141 H142 H143 H181 H182 H211
H401 H402 H403 H404 H405 H441 H442 H443 H444 H481
H521 H522 H523 H541 H542 H543 H581 H582 H583 H600
H608 H683 H689 H7 H721 J011 J171 J197 J221 J241
J271 J290 J321 J341 J371 J471 J521 J522 J523 J581
J592 L355 L922 L943 L999 M121 M122 M123 M124 M125
M126 M129 M135 M143 M149 M210 M211 M212 M213 M214
M231 M232 M233 M262 M271 M272 M273 M280 M281 M282
M283 M311 M312 M313 M314 M315 M316 M321 M322 M323
M331 M332 M333 M340 M342 M343 M344 M349 M352 M371
M372 M373 M381 M383 M391 M392 M393 M413 M414 M510
M520 M521 M522 M523 M530 M531 M532 M533 M540 M710
M903 P135 P616 V811

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1985-103186



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

0 155 871
A1

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 85400322,5

⑭ Date de dépôt: 21.02.85

⑬ Int. Cl. 4: C 07 C 69/734

C 07 D 213/42, C 07 D 277/04
C 07 C 67/327, C 07 C 67/00

⑬ Priorité: 22.02.84 FR 8402581

⑭ Date de publication de la demande:
25.09.85 Bulletin 85/39

⑬ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

⑬ Demandeur: Etablissement Public dit: CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
15, Quai Anatole France
F-75007 Paris(FR)

⑭ Inventeur: Boudet, Alain
18 rue Caubère
F-31400 Toulouse(FR)

⑭ Inventeur: Cazaux, Louis
Vigoulet-Auzil
F-31320 Castanet-Tolosan(FR)

⑭ Inventeur: Gorrion, Liliane
20, rue des Cèdres
F-31400 Toulouse(FR)

⑭ Inventeur: Grand, Claude
6, Impasse Dordiac
F-31650 Saint-Orens de Gameville(FR)

⑭ Mandataire: Peaucelle, Chantal et al,
Cabinet Plasseraud 84, rue d'Amsterdam
F-75009 Paris(FR)

⑮ Composés possédant, notamment, des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la lignification dans les végétaux et procédé
pour la réduction de leur taux de lignine.

⑯ Les composés possédant des propriétés inhibitrices
vis-à-vis de la biosynthèse de la lignine dans les végétaux
répondent à la formule:

$$Ar-C(R_1) = C(R_2) - Y$$

dans laquelle:

— Ar représente au moins un cycle aromatique ou
hétérocyclique, le cas échéant, substitué,
— R_1 et R_2 , identiques ou différents l'un de l'autre,
représentent un atome d'hydrogène, d'halogène ou un
groupe alcoyle ou alcoxy et Y un groupe fonctionnel.

EP 0 155 871 A1

- 1 -

"Composés possédant, notamment, des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la lignification dans les végétaux et procédé pour la réduction de leur taux de lignine"

L'invention est relative à de nouveaux
5 composés et compositions dotés, notamment, de propriétés inhibitrices vis-à-vis de la lignification dans les végétaux.

Elle concerne également un procédé de traitement des végétaux afin de réduire leur taux
10 de lignine et ses applications industrielles en particulier dans le domaine de l'alimentation humaine et animale.

Les lignines sont des polymères phénoliques élaborés par les végétaux, formés de motifs monomères de trois types, 15 à savoir d'alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylque.

La biosynthèse de ces motifs monomères est réalisée dans la plante, à partir de phénylalanine selon un processus comportant plusieurs étapes dans lesquelles 20 interviennent de nombreuses enzymes.

Les deux dernières étapes de la biosynthèse des monomères qui sont spécifiques de la lignification, correspondent à des étapes de réduction et sont catalysés respectivement par la cinnamoyl :CoA réductase (désignée ci-après par CCR) et l'alcool cinnamylque déshydrogénase (désignée par CAD).

La teneur en lignines et les proportions relatives des trois monomères ainsi que leur mode de liaison sont variables d'une espèce à l'autre et selon l'âge et la nature du tissu et des cellules considérées.

D'une manière générale, les lignines sont synthétisées dans les parois des cellules telles que le xylème et le sclérenchyme, assurant par là des fonctions importantes de soutien et de conduction.

5 Elles constituent cependant un obstacle à l'utilisation optimale des végétaux dans divers domaines.

Ainsi, dans la nutrition animale, on constate que des taux de lignines importants, par exemple, dans les plantes fourragères, nuisent à la digestibilité 10 des plantes par les animaux.

En outre, on observe dans certaines productions végétales une lignification intense, après la récolte, qui les rend rapidement improches à la consommation.

Ainsi, des tubercules tropicaux tels que les 15 ignames, utilisés pour l'alimentation humaine, ne peuvent plus être consommés au bout de quelques semaines après leur récolte en raison d'une nouvelle synthèse de parois secondaires lignifiées.

De plus, dans certaines plantes, par exemple, 20 chez les plants de tomates, on constate un antagonisme entre la production de lignine et la croissance de la plante, une lignification rapide réduisant les possibilités de croissance cellulaire.

Diverses solutions ont été alors recherchées 25 pour réduire les taux de lignine. Le terme général de lignine désigne dans la suite de la description et dans les revendications les différentes lignines évoquées ci-dessus.

Par mutagénèse, ou par croisement, on a pu ainsi 30 obtenir une hypolignification des plantes fourragères conduisant à une meilleure ingestibilité et digestibilité.

par les animaux. Toutefois, leur faible productivité ne permet pas une exploitation de telles variétés à l'échelle industrielle.

5 On a également envisagé d'inhiber spécifiquement, par voie chimique, des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la lignine.

Cependant, d'une manière générale, les inhibiteurs proposés présentent l'inconvénient d'agir sur d'autres constituants biochimiques importants de la plante.

10 L'invention a donc pour but de fournir de nouveaux inhibiteurs permettant de réduire le taux de lignine dans les plantes en agissant sur le processus de lignification sans perturber de manière significative la synthèse de constituants biochimiques importants tels que protéines, acides nucléiques, chlorophylles, 15 polysaccharides pariétaux et autres produits.

Elle a également pour but de fournir un procédé de traitement des végétaux permettant d'abaisser leur teneur en lignine d'au moins 20 à 30%.

20 Elle vise, en outre, à fournir une famille d'inhibiteurs de synthèse de la lignine dont l'utilisation permet notamment d'améliorer la digestibilité des végétaux destinés à l'alimentation humaine et animale et leur conservation.

25 Les composés possédant des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la biosynthèse de la lignine dans les végétaux répondent à la formule I :

$$Ar-C(R_1) = C(R_2) - Y$$

dans laquelle :

30 - Ar représente au moins un cycle aromatique, en particulier, un groupe phényle ou un hétérocycle, en particulier, un hétérocycle azoté tel qu'un radical

pyridyle ou pyrimidyl . le groupe aromatique ou hétérocyclique étant, le cas échéant, substitué par au moins un radical Z en position ortho, méta ou para, Z étant choisi de préférence parmi le groupe -OH, alcoxy renfermant notamment de

5 1 à 4 atomes de carbone, -NH₂, -NH (alc. ou M), -N-(alc.)₂, alc. représentant un groupe alcoyle, notamment de 1 à 4 atomes de carbone et M représentant un radical aromatique tel qu'un groupe phényle ;

- R₁ et R₂, identiques ou différents

10 l'un de l'autre, représentent un atome d'hydrogène, d'halogène ou un groupe alcoyle ou alcoxy, de préférence de 1 à 4 atomes de carbone, et

- Y représente un groupe fonctionnel tel qu'un groupe de structure -C-OR, -CR, -C-SR,

15 -C-N(R')R, -CH₂OR, -CH(R')-OR, -CH=N-R, R et R', identiques ou différents l'un de l'autre représentant un atome d'hydrogène, un radical alcoyle linéaire ou ramifié, notamment de 1 à 4 atomes de carbone un radical -(CH₂)_n-N₂, n étant un entier, identique ou différent pour R et R', de préférence de 1 à 4, ou

20 au moins un cycle aromatique ou encore un hétérocycle, notamment un radical thiazolyle ou pyridine, l'atome d'azote étant, le cas échéant, un élément de l'hétérocycle, et les dérivés de ces groupes fonctionnels.

D'une manière avantageuse, ces inhibiteurs comportent des éléments de reconnaissance du site actif des enzymes impliquées spécifiquement dans le processus de lignification et entrent ainsi en compétition avec le substrat des enzymes au niveau de sa fixation.

L'activité de ces composés est d'autant plus forte que leurs éléments structuraux les rapprochent des substrats de l'enzyme à inhiber.

Un groupe préféré de dérivés mis en oeuvre selon l'invention comprend au moins un dérivé de formule I dans laquelle Y représente un groupe ester.

Le substituant Y, dans un autre groupe, présente la structure $-\text{CH}=\text{N}-\text{R}$.

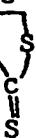
5 Dans un autre groupe de produits, Y représente un radical $-\text{C}-\text{SR}$. Des dérivés de ce radical, par exemple, des groupes de structure $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCO}-\text{R}$ constituent des produits intéressants.

Un autre groupe avantageux renferme au moins un dérivé de formule I dans laquelle Y représente un éther d'alcool primaire ou secondaire.

10 Dans encore un autre groupe préféré Y représente un dérivé de cétone.

Un autre groupe préféré encore comprend, comme substituant Y, un radical amide de structure $-\text{C}-\text{N}(\text{R}^{\prime \prime})\text{R}$. Des produits préférés de ce type comprennent un

15 substituant Y représentant un groupe $-\text{CO}-\text{NH}-\text{hétérocycle}$, en particulier $-\text{CO}-\text{NH}-\text{O}$ ou $-\text{CO}-\text{N}$



Des dérivés de ces différents groupes.

particulièrement préférés en raison de leur action inhibitrice élevée vis-à-vis de la CAD comprennent des substituants 20 R_1 et R_2 différents l'un de l'autre.

Dans des composés de ce type. R_1 représente avantageusement un atome d'halogène (F, Cl, Br ou I), ou encore un groupe alcoyle et R_2 représente un atome d'hydrogène.

25 D'autres dérivés de ces différents groupes dotés d'une grande efficacité pour moduler en baisse le taux de lignine de végétaux comprennent des substituants R_1 et R_2 identiques.

Des composés avantageux de ce type comportent 30 des substituants R_1 et R_2 représentant tous deux de l'hydrogène.

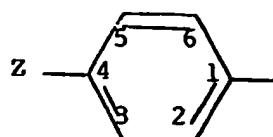
- 6 -

Indépendamment des significations préférées de Y, R₁ et R₂ mentionnées ci-dessus, ou le cas échéant, en plus de ces significations, des composés préférés renferment selon l'invention un groupe Ar représentant au moins un groupe phényle.

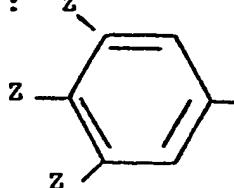
D'autres composés présentant également un 5 intérêt au regard des applications envisagées renferment un groupe Ar comportant au moins un hétérocycle. Des hétérocycles conduisant à des produits de grande efficacité comprennent des groupes pyridyle, pyrimidyle ou leurs dérivés tels que le groupe nicotinamide.

10 En ce qui concerne le groupe -Ar, il s'agit d'un groupe non substitué ou de préférence substitué par un ou encore plusieurs groupes Z, en position ortho, ortho', méta, méta' et/ou para, identiques ou différents les uns des autres.

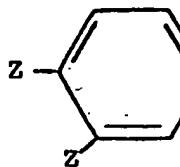
15 Un groupe Ar préféré comporte un substituant Z en para et répond à la formule



20 D'autres produits dotés d'une efficacité inhibitrice élevée comprennent un groupe Ar substitué en outre en méta et méta' (à savoir sur les positions 3 et 5), de formule : Z



Dans d'autres produits encore, Ar
représente un radical de formule :



Des significations préférées de Z
correspondent à un groupe-hydroxy en position para et
alcoxy en position méta et/ou méta', notamment, méthoxy.

Les composés correspondants dans lesquels

5 Ar comprend, au lieu d'un groupe phényle, un hétérocycle, en particulier, un hétérocycle azoté tel qu'un cycle pyridyle ou pyrimidyle, constituent également des composés avantageux.

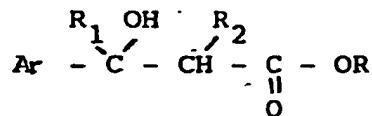
Les dérivés de formule I dans laquelle Y représente un groupe $- C - OR$ sont préparés par condensation



d'un énolate de formule II avec un aldéhyde aromatique de formule III :



ce qui conduit à un dérivé de formule



qui est soumis, au cours de l'étape suivante, à une réaction de déshydratation permettant d'obtenir le produit de formule I recherché.

Dans ces formules Ar, R, R₁ et R₂ présentent les significations données ci-dessus et M représente un cation métallique.

L'étape de condensation est avantageusement réalisé à une température voisine de 0°C en milieu solvant anhydre. Un solvant du type du tétrahydrofurane convient à cet effet. L'énolate mis en oeuvre est obtenu par réaction de l'ester avec un dérivé organométallique. Cette réaction est avantageusement réalisée à température inférieure de préférence à -50°C, et en milieu solvant anhydre.

Pour l'étape de déshydratation, on utilise un agent de déshydratation du type de chlorure de thionyle

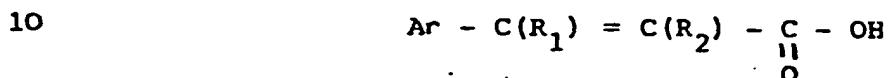
Le rendement élevé de ces étapes, voire pratiquement quantitatif, confère un grand intérêt à cette voie de synthèse.

Ce mode opératoire est également avantageusement applicable à la préparation des dérivés dans lesquels

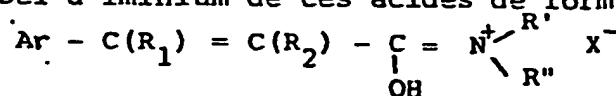
Y représente un groupe cétone ou amide. On met alors en oeuvre dans le procédé ci-dessus la cétone ou l'amide approprié à la place de l'ester.

5. Des produits dans lesquels Y représente un groupe $-\text{CH} = \text{N} - \text{R}$ sont obtenus par exemple par addition d'une amine NH_2R sur l'aldéhyde aromatique, suivie d'une déshydratation.

En variante, on utilise comme produit de départ des acides de formule :



et on forme le sel d'iminium de ces acides de formule :



X^- représentant un anion.

15 Dans ces formules, Ar, R_1 et R_2 présentent les significations données ci-dessus et R' et R'' identiques ou différents l'un de l'autre, représentent avantageusement un groupe alcoyle ou acyle.

20 Pour former ces sels d'iminium, on opère avantageusement selon le procédé décrit par Böhme et Viehe dans *Iminium Salt in organic chemistry* in *Advanced organic chemistry* - Ed - E.C. Taylor - Vol 9 - Part 1 et 2 - John Wiley and sons - N.Y. 1976 et 1979.

25 Les sels d'iminium sont préparés en opérant par exemple selon la méthode décrite dans *Tetrahedron Letters*, 1983, vol. 24, n° 14, p. 1543.

En traitant le sel d'iminium de l'acide de départ par un excès d'alcool, on obtient l'ester correspondant.

30 Pour préparer des dérivés comportant un groupe terminal amide, à la place du groupe ester, on opère avantageusement comme décrit ci-dessus, mais on utilise un dérivé métallique d'amide, tel qu'un dérivé lithié.

De même, les éthers sont élaborés en utilisant un excès d'alcool linéaire ROH, ou une quantité stoechiométrique, et les thioléthers, à partir de RSH.

Les composés de synthèse définis ci-dessus

10 possèdent un effet inhibiteur élevé vis-à-vis de la production de lignine.

15 L'étude effectuée *in vitro* concernant l'action de ces produits a montré leur forte action inhibitrice vis-à-vis de la CAD purifiée. Compte-tenu des résultats obtenus en étudiant des composés diversement substitués, il apparaît que ces composés agissent comme des inhibiteurs du type analogues de substrats. Leur action inhibitrice est donc réversible.

20 Les résultats obtenus *in vitro* ont été avantageusement confirmés *in vivo*. On mesurera l'intérêt de cette action *in vivo*, qui ne pouvait être prévisible, ainsi qu'il est bien connu dans ce domaine, sur la base des résultats observés *in vitro*. Les travaux effectués à cet égard ont montré une action sur la synthèse des 25 flavonoïdes conduisant à une réduction de leur production. Cependant, la synthèse des constituants biochimiques principaux n'apparaît pas affectée dans son ensemble de manière significative. On n'observe pas en outre d'effet sur les métallo-enzymes des végétaux autres que la CAD.

30 L'invention vise donc l'utilisation de ces composés pour réduire le taux de lignine des végétaux

selon laquelle on met en oeuvre une quantité efficace d'au moins un composé de formule I.

Ces compositions d'inhibiteurs, selon l'invention, se présentent avantageusement sous forme de 5 poudre à diluer au moment de l'emploi, ou de solutions, de préférence de solutions aqueuses renfermant ces inhibiteurs.

Les préparations sous forme de solutions aqueuses renferment avantageusement les inhibiteurs en 10 question à raison d'au moins 200 μM . Des préparations préférées renferment de 200 μM à 500 μM , avantageusement de 200 à 300 μM .

Ces préparations peuvent, en outre, renfermer d'autres ingrédients utiles à la plante, notamment, des éléments nutritifs et/ou des agents de traitement.

L'application est réalisée de préférence dans la phase ou les phases de lignification intense du végétal. On opère par pulvérisations, arrosage ou autre 20 mode approprié au type de végétal traité.

Compte-tenu de la sensibilité de l'action des composés de l'invention, on renouvelle avantageusement le traitement à plusieurs reprises.

Une pulvérisation, trois à quatre fois, 25 par exemple, à environ 15 jours d'intervalle, sur la production végétale, au moment de la phase de croissance du végétal, permet de réduire le taux de lignine de manière satisfaisante. Ce traitement est utilisable sur des espèces végétales variées telles que, par exemple, le peuplier, le maïs, les 30 plantes à tubercules et autres productions végétales.

Dans le cas de plantes fourragères, il en résulte une ingestibilité et une digestibilité accrues de ces dernières par les ruminants, permettant ainsi une augmentation de la productivité.

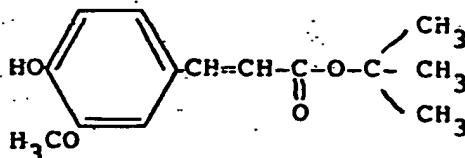
5 Le procédé de l'invention revêt également un intérêt essentiel dans l'alimentation humaine en permettant de réduire le taux de lignines dans les productions végétales comme évoqué ci-dessus. Une pulvérisation au moment du stockage des végétaux renouvelée à une semaine 10 d'intervalle environ deux à toutefois, s'avère généralement satisfaisante.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent donnés à titre illustratif.

EXEMPLE 1 : Préparation de dérivés de formule I dans laquelle X représente un groupe - C-OR-

On prépare le férulate de tertiobutyle (FTB) de formule :

5



par condensation, au cours d'une première étape a), de l'énolate de l'ester tertio-butylique avec la vanilline, suivie d'une déshydratation, durant une deuxième étape b), du produit de condensation formé.

10

Ces étapes sont réalisées comme suit :

a) A une solution de 10mM d'isopropyl-amidure de lithium en solution dans 10 ml de tétrahydrofurane (THF), on ajoute à 78°C, goutte à goutte, 10 mM d'acétate de tertiobutyle.

15

On maintient 15 mn à -78°C à l'abri de l'air et de l'humidité. On ajoute ensuite à l'aide d'une seringue, goutte à goutte, 4mM de vanilline dans 8ml de THF et on amène la température à 0°C. Après 1 heure sous agitation, on hydrolyse à l'aide de NH₄Cl en solution

20

saturée dans l'eau. On ajoute 10 ml et on extrait par l'éther (2 fois 20 ml). Après décantation et séchage sur carbonate de potassium, on élimine le solvant (rendement en β -hydroxy ester : 85%).

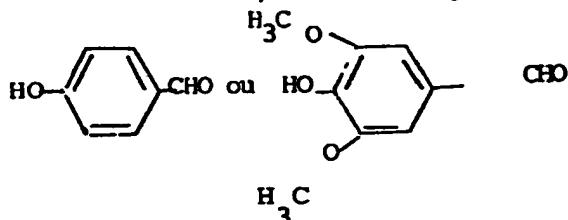
25

b) A 4 mM de 50 Cl₂, en solution dans 4 mM de pyridine, on ajoute 2mM du β -hydroxyester obtenu à l'étape précédente. Il se forme un mélange visqueux brun qu'on maintient sous agitation 5 à 10 mn. On procède ensuite à une hydrolyse et une extraction par l'éther en opérant comme dans l'étape a). Le rendement

est quantitatif. ($R_f = 0,66$ (chloroforme avec 5 % de méthanol) ; R_f du produit de départ : 0,46).

En opérant comme décrit ci-dessus, mais en utilisant à la place de l'ester, le dérivé de cétone 5 de thiol , on obtient les dérivés correspondants dans lesquels le groupe $-C-O$ -tertio-butyle est remplacé respectivement par le groupe $-C$ -tertio-butyle et $-C-S$ -tertio-butyle.

Dans d'autres essais, on utile à la place 10 de la vanilline, des aldéhydes aromatiques de formule :



EXEMPLE 2 : Variante de préparation du FTB :

15 On ajoute à 0°C, le chlorure de l'acide oxalique (0,5 ml) à une solution de diméthylformamide (DMF) distillée et séchée sur tamis (2mM; 0,154 ml) dans 3 ml de CH_2Cl_2 anhydre.

20 On maintient l'agitation pendant 1 heure puis on évapore le solvant à l'abri de l'humidité. On obtient une poudre blanche.

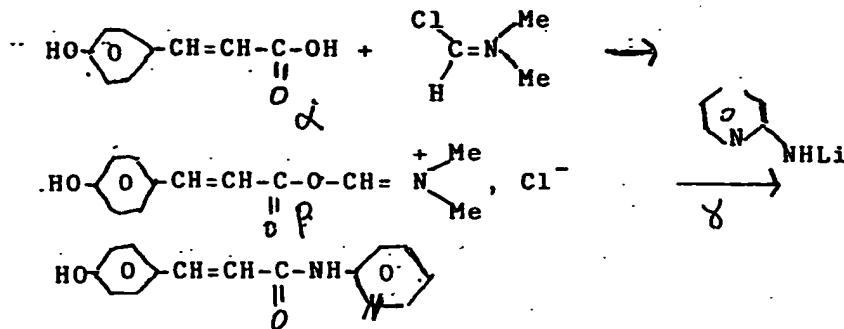
25 A -30°C, on ajoute à ce résidu, 3 ml d'acéto-nitrile, 5ml de THF anhydre et une solution de 2mM d'acide férulique, de 2mM de pyridine dans 3ml de THF. L'addition se fait goutte à goutte. Le mélange réactionnel devient jaune. On maintient l'agitation pendant 1 h et on ajoute, à - 30°C, un excès de méthanol (4ml) goutte à goutte.

On maintient l'agitation durant 30 mn puis on hydrolyse à l'aide de HCl 0,5N, on extrait à l'éther et on

neutralise par du bicarbonate de sodium à 5%. Le R_f dans CH_2Cl_2 renfermant 5% de méthanol est de 0,63 et le rendement de 96%.

EXEMPLE 3 : Préparation d'amides des acides cinnamiques :

5 On opère selon le schéma réactionnel ci-dessous :



6) Les composés à δ indiqués sur ce schéma sont préparés 10 respectivement selon les étapes suivantes :

- A 0°C , sous azote et agitation magnétique, 4 mmoles (1ml) de chlorure d'oxalyle sont ajoutées goutte à goutte à la seringue à travers un septum à une solution de 4 mmoles de DMF anhydre (0,29 g; 0,31 ml) dans 6 ml de CH_2Cl_2 . À la fin du dégagement gazeux, l'agitation est maintenue 1 h à 0°C . Après élimination du solvant, on obtient une poudre blanche très sensible à l'humidité.

7) Préparation du chlorure de carboxy méthyléniminium

La poudre est mise en solution dans 16 ml de THF anhydre. 20 On ajoute à -30°C goutte à goutte une solution de 3,6 mmoles d'acide (0,7 g de 1a, 0,85 g de 1b), de 4 mmoles de pyridine (0,32 g) et de 6 ml de THF. Le milieu réactionnel est soumis à agitation 1 heure à -30°C et devient d'une consistance visqueuse et d'une couleur jaune pâle. (1a et 1b correspondent respectivement à l'acide férulique et à l'acide O-acétyl férulique).

8) Préparation de l'amino-pyridine lithiée :

On opère à -30°C à partir de 12 mmoles (7,5 ml) de butyl-lithium (1,6 M dans l'hexane) et de 12 mmoles (1,13 g)

- 16 -

de 2-aminopyridine dans 12 ml de THF (agitation pendant 30°C.

6) Sur le lithium on verse le sel d'iminium préparé ci-dessus sous azote, par l'intermédiaire d'un coude de verre fbdé reliant les deux réacteurs.

Le milieu réactionnel est réchauffé à la température ambiante et l'agitation est maintenue pendant 2 heures.

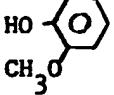
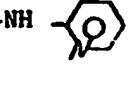
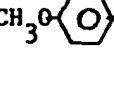
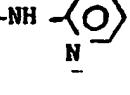
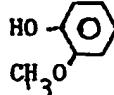
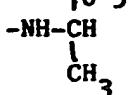
Après hydrolyse, et extraction à l'acétate d'éthyle, le DMF formé est distillé.

10 Le produit brut réactionnel (1 g) est purifié en chromatographie sur colonne éluant CH_2Cl_2 /acétate d'éthyle 9/1) et, si nécessaire, en HPLC. On obtient après purification 196 mg ; 20% de produit attendu.

Les produits Ar- rapportés dans le tableau

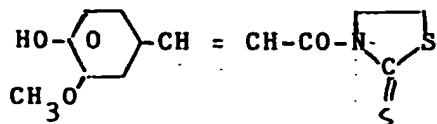
15

suivant ont été préparés en opérant selon les exemples ci-dessus.

	Ar	R	Rdt %
(hydroxy-4 méthoxy-3 phényl)-3N(pyridyl-2)propène 2 amide			20 FAP
(méthoxy-4 phényl)-3N(pyridyl-2)propène 2 amide			80
(hydroxy-4 méthoxy-3 phényl)-3			72 FMT

EXEMPLE 4 :

- Synthèse du N[hydroxy-4 méthoxy-3 phényl) 3 propène-2 zoyl] thioxo 2 thiazolidine ou FMT, de formule :



5 Ce composé a été préparé selon la méthode de Fujita et al dans J.C.S. Perkin I, 11, 2470-2573, 1980, soit en utilisant le dicyclo carbodimide, soit à partir du chlorure de l'acide ferulique (le groupe hydroxyle est protégé) en présence de sel de thallium.

10 EXEMPLE 5 : Action in vitro d'inhibiteurs selon l'invention sur la lignification de végétaux.

Les études dont les résultats sont rapportés ci-après ont été effectuées sur de jeunes plants de peuplier et de maïs, variété INRA 400, obtenus en salle conditionnée (température maintenue à 22°C, humidité de 60 à 80% de saturation, éclairement de 10 000 lux, héméropériode de 12 heures).

15 Les plants de peuplier sont obtenus à partir de boutures de l'année (segments de tiges de 15 cm), placées dans des bacs contenant de la vermiculite et arrosées quotidiennement par une solution nutritive riche en azote présentant la composition suivante :

Composés	Concentrations g/l
KNO ₃	0,303
KH ₂ PO ₄	0,102
K ₂ HPO ₄	0,043
5 NaCl	0,011
Ca(NO ₃) ₂	0,410
Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	0,455
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,590
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,184
10 NH ₄ NO ₃	0,160
Séquestrène de fer	0,59x10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69 x 10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 x 10 ⁻³
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,29 x 10 ⁻³
H ₃ BO ₄	1,86 x 10 ⁻³
15 (NH ₄) ₆ O ₂₄ Mo ₇ .4H ₂ O	0,035 x 10 ⁻³

Les échantillonnages ont été effectués à partir de jeunes plants de peuplier âgés de 3 mois et comportant entre 20 et 25 entrenoeuds.

Les fractions tissulaires ont été obtenues par grattages

5 successifs au scalpel selon la méthodologie décrite par GRAND, thèse de 3ème cycle, 1979, Université de Toulouse.

Dans tous les cas, le végétal est stabilisé dans l'azote liquide, puis lyophilisé pendant 48 h et conservé à -20°C dans des flacons colorés et bouchés.

10 Les semences de maïs sont mises à imbiber pendant 14 heures dans l'eau distillée, à la température ambiante, puis enfouies à 1 cm de profondeur dans la vermiculite répartie dans des bacs en polyéthylène.

Les bacs sont arrosés quotidiennement par une solution

15 nutritive présentant la composition suivante :

Composés	Concentrations g/l
KHCO ₃	1.01
KH ₂ PO ₄	0.27
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.96
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	2.36
FeCl ₃	0.97 x 10 ⁻³
EDTA (Na ₂)	1.12 x 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	0.35
MnSO ₄ · H ₂ O	0.35
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	-0.07

- 20 -

En vue du dosage des lignines, le matériel végétal est préparé selon la méthode décrite par ALIBERT et BOUDET dans Physiol.vég.17. 75-82, 1979.

5 50 à 500 mg de végétal lyophilisé, réduit en poudre au broyeur à billes Dangoumeau (Prolabo) est extrait par 10 ml d'eau distillée (3 fois), soumis à agitation 5 mn, puis à une opération de centrifugation durant 5 mn à 3000 g.

10 On récupère le culot de centrifugation puis on l'extrait à l'aide de 10 ml de NaCl M, 2% en Triton X 100 (3 fois) et on soumet le mélange à agitation 5 mn.

15 Après une centrifugation de 5 mn, à 3000 g, on récupère le culot qu'on extrait en continu par un mélange alcool-benzène ($\frac{1}{2}$; v/v) avec un débit de 1ml, mn^{-1} (1 l/g de matériel végétal).. Le résidu obtenu est rincé avec de l'éthanol absolu et séché sous vide.

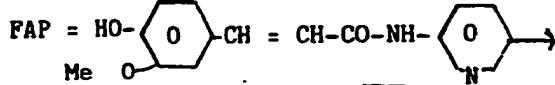
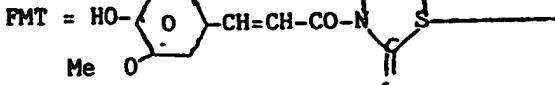
La préparation obtenue, appelée "poudre alcool-benzène" correspond à une fraction pariétale enrichie en lignines et polysaccharides (cellulose, hémicelluloses).

20 Les acides cinnamiques, liés aux lignines sous formes d'esters, sont libérés par hydrolyse des "poudres alcool-benzène" par de la soude 2N pendant 1 heure sous atmosphère d'azote.

25 Après réacidification à pH2 par de l'acide chlorhydrique 3N et centrifugation, le surnageant contenant les acides cinnamiques est séparé du résidu. Les "poudres alcool-benzène" ainsi hydrolysées sont lavées par de l'eau distillée jusqu'à pH neutre et séchées, sous 30 vide dans un dessiccateur en présence de silice-gel. Les teneurs en lignines sont estimées par la méthode

gravimétriques de KLASON (Tappi Standard method T12m) modifiée par EFFLAND décrite dans Tappi, 50, 143-144)

On rapporte dans le tableau suivant les résultats obtenus concernant l'effet mesuré *in vitro* d'inhibiteurs 5 selon l'invention à différentes concentrations vis-à-vis de la CAD de peuplier isolée selon la méthode de SARNI et al. dans *EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY*, 139, p. 259-265, 1984.

Composé	Inhibition % à 2mM
p-Coumarate de tertiotbutyle (PCB)	40
Ferulate de tertiotbutyle (FTB)	75
Styrate de tertiotbutyle (STB)	55
FAP = HO-  = CH-CO-NH- 	inhibition à 0,062 0,125 0,250mM 28 100
FMT = HO-  -CH=CH-CO-N 	0 66 100
PTB	29 63 100

Les mesures des trois derniers résultats ont été 10 réalisées dans le sens physiologique c'est-à-dire en suivant la réduction de l'aldéhyde coniférylique (oxydation du NADPH mesurée à 340 nm).

Cette inhibition mesurée *in vitro* dans le sens physiologique (pH 6,5) est 10 à 15 fois plus importante 15 que dans le sens inverse, c'est-à-dire alcool → aldéhyde (pH 8,8).

Ces résultats montrent l'efficacité d'inhibiteurs de l'invention.

5 Le dérivé désigné FTB dans lequel le noyau aromatique est substitué en para et en méta permet d'obtenir des taux d'inhibition d'environ 75 %.

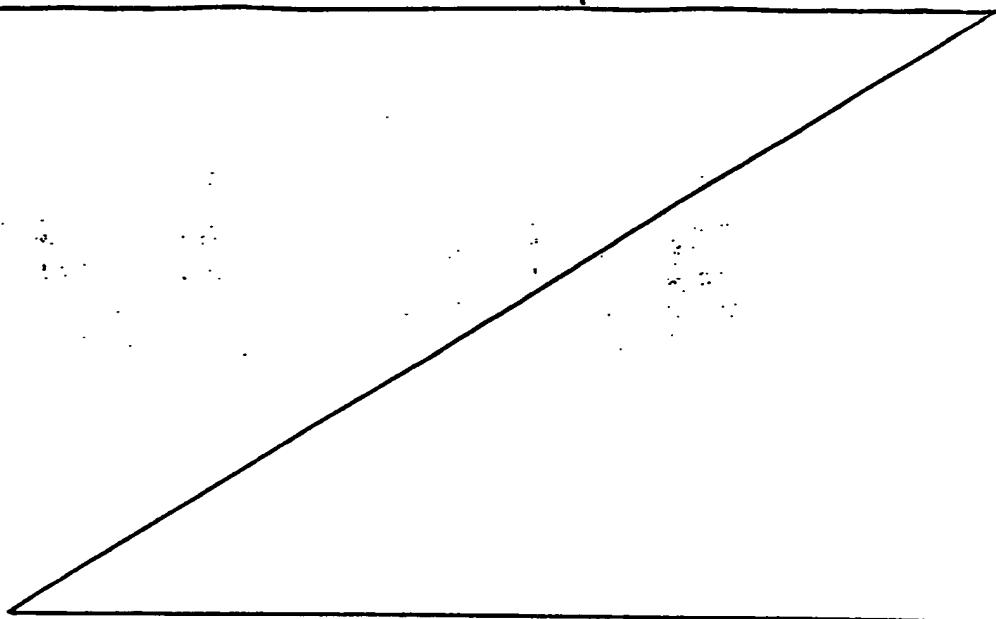
10 Les dérivés correspondants dans lesquels la chaîne est saturée donnent respectivement des taux d'inhibition de 15, 20 et 25 %. Les meilleurs résultats obtenus avec l'insaturation éthylénique confirme l'analogie d'action avec les substrats naturels de l'enzyme.

15 L'étude *in vitro*, dans les conditions rapportées ci-dessus, de dérivés comportant un hétérocycle azoté et/ou des groupes terminaux éther, alcool, thiols, cétone, amide ou acide, a également confirmé l'efficacité de ces produits vis à vis de l'inhibition de la CAD.

20 L'étude des modalités d'action des inhibiteurs de l'invention montre la réversibilité de leur action. Ainsi, la dialyse d'un mélange enzyme - FTB, à la concentration de 2 mM contre un tampon tris/HCl 0,1 M, pH 7,5, pendant 14 heures à 4°C et la mesure avant et après dialyse de l'activité de CAD, montre une restitution totale de l'activité CAD.

25 L'étude de leur action sur différentes enzymes a également été réalisée.

30 On a étudié ainsi l'action d'inhibiteurs selon l'invention sur des enzymes du métabolisme phénolique telles que la phénylalanine ammonialyase (PAL), la catéchol O-méthyl transférase (OMT), l'hydroxycinnamate : CoA ligase (HCl) et la cinnamoyl : CoA réductase (CCR), et des enzymes végétales à zinc, telles que l'éthanol déshydrogénase (EDH), la superoxyde dismutase (SOD) et l'anhydrase carbonique (CA).



Les résultats obtenus, par exemple avec le FTB montre qu'il n'agit pas sur l'EDH, la SOD et l'AC. En revanche, il s'avère actif, mis à part la CAD, vis à vis de la PAL et de la CCR.

EXEMPLE 6 : Action in vivo d'inhibiteurs selon l'invention sur la lignification.

On rapporte ci-après les résultats obtenus avec les composés du tableau ci-dessus.

0 Pour évaluer l'effet de ces inhibiteurs sur le processus de lignification, on a étudié notamment leur action :

0.5 1) sur le taux d'incorporation d'un traceur radioactif correspondant à un précurseur des lignines, à savoir l'acide cinnamique ($^{14}\text{C}_3$), dans des fractions de xylène de peuplier isolées à partir de tiges de peuplier (ce qui représente un moyen rapide d'évaluer le flux de synthèse des lignines sur un système simplifié) et dans les parties aériennes du peuplier (ces expériences de plus longue durée conservent un caractère de mesure dynamique, se rapprochant des conditions physiologiques).

2) sur les quantités de lignines formées par des cultures de plusieurs semaines de plants de maïs, réalisées en présence d'inhibiteurs. Dans ce cas, l'effet est observé sur l'accumulation du polymère dans des conditions naturelles.

5 1)- Etude de l'effet des inhibiteurs sur la synthèse des lignines radioactives à partir d'acide cinnamique ($^{14}\text{C}_3$).

10 a) Dans des fractions de xylème isolées à partir de tiges de peuplier.

15 L'acide cinnamique (149mCi/mmole, CEA) est apporté aux fractions tissulaires isolées à partir de jeunes tiges de peuplier selon la technique de GRAND décrite dans la thèse de 3ème cycle mentionnée ci-dessus.

20 Les tissus de xylème isolés (300 mg par essai) sont mis en suspension dans des fioles d'erlenmeyer (25ml), bouchées par du coton cardé contenant :

25 - du tampon Tris/HCl, 0,1M, pH 7,5 (qsp 5ml) maintenant le pH entre 7 et 8,

30 - du Dextran T40 (25 g/l) utilisé comme agent osmotique, ne constituant pas une source de carbone pour la cellule végétale,

35 - du mercaptoéthanol (0,1mM), antioxydant qui empêche un brunissement très rapide des tissus,

40 - de l'éther monométhylique de l'éthylène glycol (EMMEG) (50 μl) ou des inhibiteurs solubilisés dans ce polyol (50 μl).

45 - de l'acide cinnamique ($^{14}\text{C}_3$) (2,5 μCi).

50 Les fioles sont placées à 26°C, sous agitation orbitale (agitateur New Brunswick modèle G 10,100 rpm) et sous un éclairement de 4000 lux pendant 30 h. La radioactivité incorporée par les lignines est alors estimée à partir de "poudre alcool-benzène" obtenu par extraction à l'alcool-benzène des fractions tissulaires lyophilisées et réduites en poudre.

Afin de mesurer l'absorption de l'acide cinnamique par les fractions tissulaires et de corriger d'éventuelles différences d'absorption selon les tissus, une fraction aléatoire du milieu d'incubation (50 μ l) est relevée à différents temps et la radioactivité estimée au compteur à scintillation liquide.

b) dans les tiges de peuplier -

Afin de vérifier chez des tiges de peuplier l'action de ces inhibiteurs, on réalise des incorporations d'acide cinnamique (5 μ Ci) à des 10 rameaux comportant 12 entrenoeuds selon la technique de la tige sectionnée décrite par BOUDET dans C.R. Acad. Sci. Paris, P 1966-1968, 269, 1969.

La radioactivité des lignines est mesurée après 96 heures de métabolisation.

15 Lorsque la métabolisation est effectuée en présence des inhibiteurs, on observe une diminution de la radioactivité incorporée dans les lignines.

2- Effet des inhibiteurs sur des plants de maïs -

20

Des plants de maïs ont été traités pendant 10, 20 ou 30 jours par les inhibiteurs de l'invention à différentes concentrations.

25 Les inhibiteurs sont ajoutés au milieu nutritif.

30 Les cultures sur vermiculite (20 plants) sont arrosées quotidiennement par 250 ml de milieu (avec ou sans inhibiteurs). Les semis constituent le temps 0 de la culture, l'addition des inhibiteurs au milieu nutritif est réalisée dès l'émergence de la partie aérienne (2 à 3 jours). Les différentes caractéristiques des plants sont estimées après 10, 20 ou 30 jours.

35

A1) Influence du traitement sur la croissance des plants de maïs -

On ne note aucune différence significative entre les plants traités et les plants témoins.

5 A2) Influence du traitement sur les teneurs en lignines -

Après hydrolyse par la soude des "poudres alcool-benzène" dans des conditions qui éliminent les acides cinnamiques estérifiés à la paroi, on estime les teneurs 10 en lignines par la méthode de KLASON.

Les résultats obtenus montrent que le traitement des plants par ces inhibiteurs conduit à une baisse significative des teneurs en lignines. Ainsi pour une concentration de 300 μ M et 30 jours de culture, le FTB 15 entraîne une inhibition d'environ 40 à 50 %.

A3) Etude de la spécificité d'action des inhibiteurs *in vitro* -

Ces études ont été réalisées sur des plants de maïs âgés de 30 jours et traités avec FTB, PCB et 20 STB.

Les teneurs en protéines solubles, chlorophilles, polysaccharides pariétaux et acides nucléiques n'apparaissent pas significativement affectées. Ces composés étant reconnus d'une manière générale comme des 25 "marqueurs" du métabolisme général, ces résultats montrent que les inhibiteurs de l'invention possèdent une action relativement spécifique sur le processus de lignification.

Des résultats analogues ont été obtenus avec 30 les inhibiteurs de formule (I) dans laquelle Ar représente un hétérocycle, en particulier, un hétérocycle azoté pyridyle ou pyrimidyle.

Les composés dans lesquels Z représente un atome d'halogène ou un groupe alcoxy ont également donné des résultats satisfaisants. De même, l'utilisation de divers groupes esters, acides, amides, thiols, cétones amines, éthers et alcools primaire et secondaire correspondants, et de leurs dérivés, sur la chaîne latérale permet d'obtenir des inhibiteurs efficaces.

5 L'ensemble des résultats ci-dessus met en évidence les propriétés avantageuses des inhibiteurs de l'invention.

10 L'étude de cette famille d'inhibiteurs a également montré qu'ils n'affectaient pas sensiblement les autres constituants biochimiques de la plante, ce qui ne pouvait être prévisible sur la base des 15 résultats *in vitro*.

15 L'efficacité de ces inhibiteurs qui se sont révélés de plus dépourvus de toxicité pour les plantes, est donc avantageusement mise à profit, selon l'invention, pour moduler en baisse la lignification des végétaux, 20 en vue de leur utilisation dans divers domaines.

L'étude de la digestibilité par les animaux de plantes fourragères telles que fétuques, luzerne hypolignifiées montre une meilleure assimilation du végétal, ce qui permet d'augmenter la productivité.

25 On a également augmenté la conservation de divers végétaux traités pendant leur culture à l'aide des inhibiteurs de l'invention.

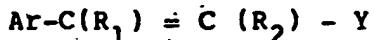
- 28 -

Des productions vététales utilisables pour l'alimentation humaine, qui habituellement deviennent impropres à la consommation deux ou trois semaines après leur récolte, peuvent être ainsi conservées 5 plusieurs mois.

D'une manière générale, l'invention fournit donc les moyens de valoriser la biomasse végétale, en réduisant le taux de lignine qui constitue quantitativement dans les végétaux le second polymère après la cellulose.

REVENDICATIONS

1.- Composés possédant des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la biosynthèse de la lignine dans les végétaux répondant à la formule I :



5 dans laquelle :

- Ar représente au moins un cycle aromatique en particulier un groupe phényle ou un hétérocycle, en particulier, un hétérocycle azoté tel qu'un radical pyridyle ou pyrimidyle, le groupe aromatique ou hétérocyclique étant, le cas échéant, substitué par au moins un radical Z en position ortho, méta ou para, Z étant choisi de préférence parmi le groupe -OH, alcoxy renfermant notamment de 1 à 4 atomes de carbone, $-NH_2$, $-NH$ (alc. ou Ar), $-N$ (alc.)₂, alc. représentant un groupe alcoyle, notamment de 1 à 4 atomes de carbone et M représentant un radical aromatique tel qu'un groupe phényle ;

- R_1 et R_2 , identiques ou différents l'un de l'autre, représentent un atome d'hydrogène, d'halogène ou un groupe alcoyle ou alcoxy, de préférence de 1 à 4 atomes de carbone, et

- Y représente un groupe fonctionnel tel qu'un groupe de structure $-C(=O)OR$, $-C(=O)R$, $C(=O)SR$, $-C(=O)N(R')R$, $-CH_2OR$, $-CH(R')-OR$, $-CH=N-R$, R et R' identiques ou différents l'un de l'autre représentant un atome d'hydrogène, un radical alcoyle linéaire ou ramifié, notamment de 1 à 4 atomes de carbone, un radical $-(CH_2)_n-N$, n étant un entier, identique ou différent pour R et R', de préférence de 1 à 4, ou au moins un cycle aromatique ou encore un hétérocycle, notamment un radical thiazolyle ou pyridine, l'atome d'azote étant, le cas échéant, un élément de l'hétérocycle, et les dérivés de ces groupes fonctionnels.

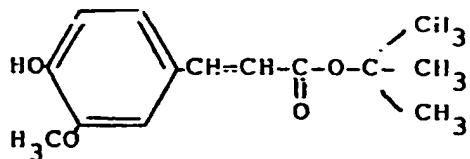
- 30 -

2.- Composés selon la revendication 1, caractérisés en ce que R_1 représente un atome d'halogène et R_2 , un atome d'hydrogène.

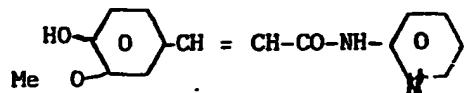
3.- Composés selon la revendication 1, caractérisés 5 en ce que R_1 et R_2 représentent de l'hydrogène.

4.- Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit :

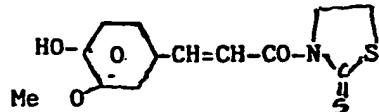
- du férulate de tertiobutyle de formule :



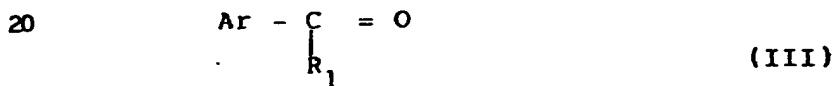
10 - du férulate d'amidopyridine de formule



- du FMT de formule :



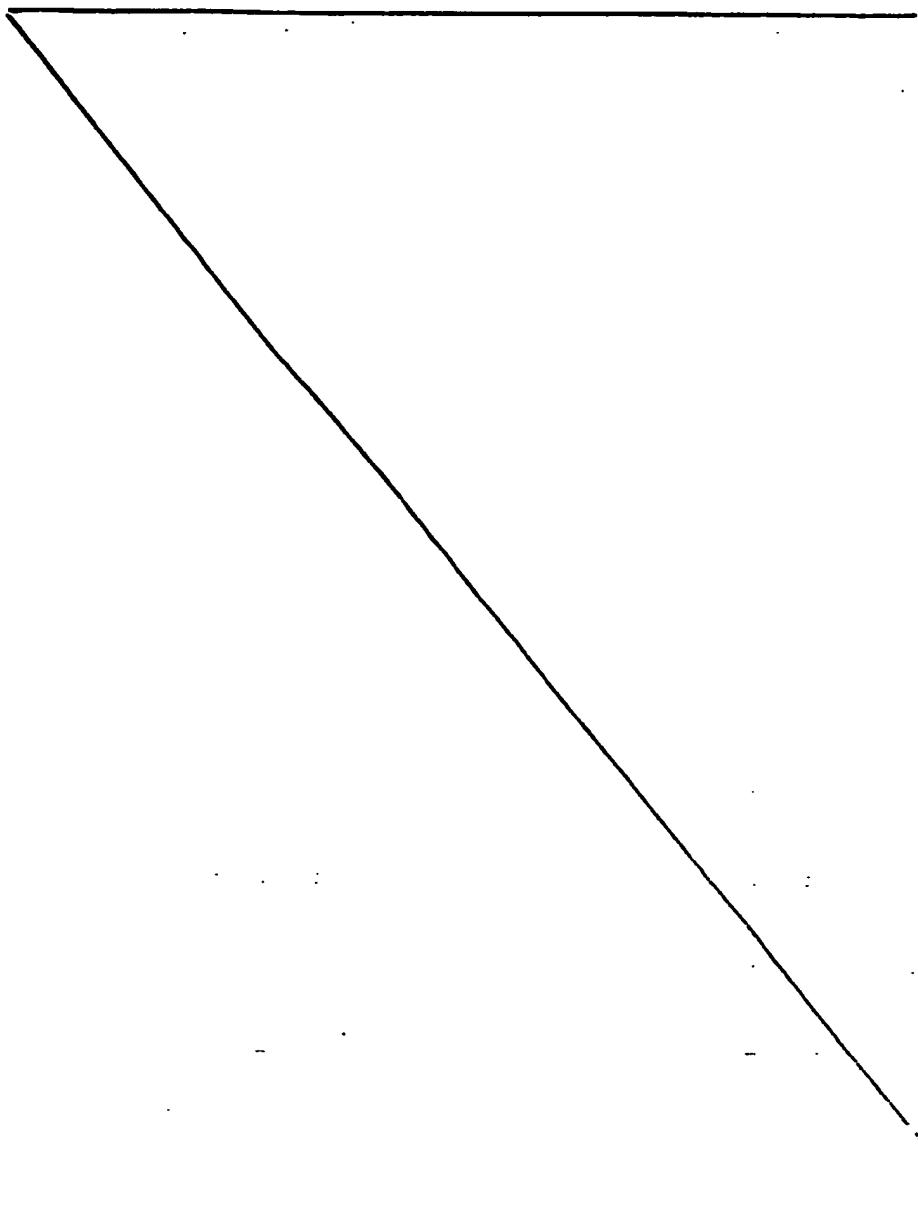
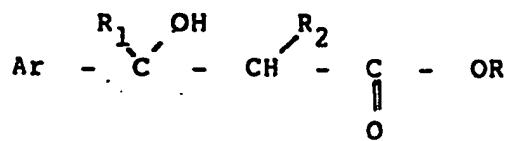
5.- Procédé de préparation de composés selon la 15 revendication 1, caractérisé en ce que lorsque Y représente un groupe $\begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ OR, on effectue la condensation d'un énolate de formule II avec un aldéhyde aromatique de formule III :



0155871

- 31 -

ce qui conduit à un dérivé de formule



qui est soumis, au cours de l'étape suivante, à une réaction de déshydratation permettant d'obtenir le produit de formule I recherché, Ar, R, R₁ et R₂ présentant dans ces formules les significations données

5 ci-dessus et M représentant un cation métallique, ou lorsque Y représente un groupe cétone ou amide, on met en oeuvre dans la réaction ci-dessus la cétone ou l'amide approprié à la place de l'ester, ou lorsque Y représente un groupe -CH = N-R, on fait réagir

10 - une amine NH₂ R avec un aldéhyde aromatique puis on soumet le produit résultant à une réaction de déshydration, ou selon une variante, pour préparer les produits dans les- quels Y représente un ester, on utilise comme produit de

15 départ des acides de formule :

$$\text{Ar} - \text{C}(\text{R}_1) = \text{C}(\text{R}_2) - \text{C}(\text{O}) - \text{OH}$$

on forme, en opérant de manière en soi connue, le sel d'iminium de ces acides de formule :

$$\text{Ar} - \text{C}(\text{R}_1) = \text{C}(\text{R}_2) - \text{C}(\text{OH}) = \text{N}^+ \text{---} \text{R}' \text{---} \text{R}'' \text{---} \text{X}^-$$

20 X⁻ représentant un anion. Ar, R₁ et R₂ présentant dans ces formules les significations données ci-dessus, R' et R'' identiques ou différents l'un de l'autre, représentant avantagusement un groupe alcoyle ou acyle, puis on fait réagir le sel d'iminium de l'acide

25 de départ avec un excès d'alcool, ce qui conduit à l'ester correspondant, ou pour préparer des dérivés comportant un groupe terminal amide, à la place du groupe ester, on opère comme décrit ci-dessus, mais on utilise un dérivé métallique d'amide, tel qu'un dérivé lithié, ou pour préparer les éthers

30 correspondants on utilise un excès d'alcool linéaire ROH, ou une quantité stoéchiométrique, les thioéthers étant obtenus à partir de RSH.

- 33 -

6.- Compositions pour réduire le taux de lignine dans les végétaux caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, le cas 5 échéant, en combinaison avec des agents nutritifs ou de traitement des végétaux.

7.- Compositions selon la revendication 6, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme de poudres à diluer ou de solutions aqueuses.

10 8.- Compositions selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme de solutions aqueuses renfermant au moins 200 μM d'au moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, de préférence de 200 à 500 μM .

15 9.- Application des compositions selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 au traitement des plantes fourragères et des productions végétales.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0155871

Numéro de la demande

EP 85 40 0322

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y	BULLETIN DES SOCIETES CHIMIQUES BELGES, vol. 85, no. 9, juillet 1976, pages 657-662,; L. VAN ROMPAEY et al.: "N-acyl amino acids and peptides. V. Improved synthesis of N-ferulylglycyl-L-phenylalanine" * Pages 658-659, composé V *	1,3,4	C 07 C 69/734 C 07 D 213/42 C 07 D 277/04 C 07 C 67/327 C 07 C 67/00
Y	EP-A-0 057 881 (KANEKA FUCHI KAGAKU KOGYO K.K.) * Page 25, revendication 1 *	1,3	
Y	FR-M- 4 305 (ELI LILLY AND COMPANY) * Pages 5,6; revendications *	1,3	
	-----		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			C 07 C 69/00 C 07 C 67/00
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE	Date d'achèvement de la recherche 03-05-1985	Examinateur KINZINGER J.M.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	